

Résumé

L'apparition d'arbres «secs» dans les plantations d'hévéas et le développement de la maladie de l'encoche sèche ont suscité des études extrêmement nombreuses. Jusqu'à présent, les causes originelles de la maladie n'ont pas été identifiées. Les facteurs génétiques intervenant au niveau moléculaire, dans les tissus producteurs, déterminent la sensibilité à la maladie de l'encoche sèche. La démarche expérimentale consiste dans la recherche, par électrophorèse bidimensionnelle, de protéines éventuellement nouvelles ou surexprimées dans le latex d'arbres malades. Les résultats présentés témoignent qu'il est possible de caractériser ces arbres par la détection de marqueurs protéiques de l'encoche sèche au niveau du latex.

Abstract

The appearance of «dry» trees in rubber plantations and the development of Tapping Panel Dryness has been the subject of a considerable number of studies. The original causes of the disease have yet to be identified. Genetic factors at molecular level in the latex producing tissues determine susceptibility to tapping panel dryness. An experimental approach involves two-dimensional electrophoresis to detect any newly or over-expressed proteins in the latex of diseased trees. The results presented show that it is possible to characterize trees affected by tapping panel dryness by detecting the corresponding protein markers in their latex.

Resumen

La aparición de árboles «secos» en las plantaciones de heveas y el desarrollo de la enfermedad de la entalladura seca suscitaron estudios extremadamente numerosos. Hasta ahora, no se identificaron las causas originales de la enfermedad. Los factores genéticos que intervienen al nivel molecular, en los tejidos productores, determinan la sensibilidad a la enfermedad de la entalladura seca. El paso experimental consiste en buscar, mediante electroforesis bidimensional, proteínas posiblemente nuevas o sobreexpresadas en el látex de árboles enfermos. Los resultados presentados atestiguan que se posibilita caracterizar los árboles afectados por entalladura seca mediante detección de marcadores protéicos de la entalladura seca al nivel del látex.

Hévéa : marqueurs protéiques de l'encoche sèche

Lacrotte R.¹ , Gidrol X.² , Vichitcholchai N.³ ,
Pujade-Renaud V.¹ , Narangajavana J.⁴ , Chrestin H.²

1 CIRAD-CP, Mahidol University, Faculty of Science, Department of Biotechnology, 10400 Bangkok, Thailand

2 ORSTOM, Mahidol University, Faculty of Science, Department of Biotechnology, 10400 Bangkok, Thailand

3 RRIT, Rubber Research Center, 24160 Chachoengsao, Thailand

4 Mahidol University, Faculty of Science, Department of Biotechnology, 10400 Bangkok, Thailand

Les résultats présentés ici sont issus d'un programme de recherche CIRAD⁽¹⁾-ORSTOM⁽²⁾ mené en Thaïlande sur la mise en évidence et la caractérisation de marqueurs protéiques du latex permettant la détection précoce de l'induction du *Tapping Panel Dryness* (TPD).

Dans les plantations d'hévéas, la production de latex de certains arbres devient parfois anormalement faible ou même inexistante. Chaque année, le nombre d'arbres atteints croît de 1 %. Ce chiffre augmente considérablement en cas de surexploitation. Cette sécheresse spontanée du panneau de saignée s'accompagne généralement de nombreuses anomalies, en particulier du brunissement de l'écorce. Ces hévéas, sérieusement affectés, ne sont alors plus saignés. La production de latex dépend du nombre d'arbres atteints, elle peut diminuer considérablement, ce qui pose alors un grave problème économique.

Dans le langage courant des chercheurs, le terme *brown bast*, qui a été affecté à l'encoche sèche, est maintenant remplacé par *Tapping Panel Dryness*. En effet, le syndrome ne se développe pas uniquement au niveau de l'encoche mais sur l'ensemble du panneau de saignée.

Ni les connaissances acquises sur la cytologie et l'histologie des arbres malades (Paranjothy *et al.*, 1976 ; de Fay et Héban, 1980 ; Hao et Wu, 1993a, 1993b ; Wu et Hao, 1994), ni celles obtenues en physiologie et biochimie, qui mettent en évidence la relation entre l'homéostasie cellulaire et la production (Van de Sype, 1984 ; Chrestin, 1989) n'ont permis de définir les causes originelles de la maladie. S'il apparaît évident que le *Tapping Panel Dryness* provient de désordres physiologiques dans le système laticigène lui-même (Chua, 1966 ; Gomez *et al.*, 1990), aucune méthode de lutte efficace n'a pu être proposée à ce jour malgré l'accumulation d'une grande masse de connaissances.

Les différents types du TPD ont été décrits par Jacob *et al.* (1994). Ces auteurs distinguent les encoches sèches ne montrant pas de nécrose et celles dites nécrotiques.

Dans le premier cas, si la structure des laticifères peut être touchée, leur métabolisme est très fortement perturbé. Il faut néanmoins distinguer l'induction de la maladie par sursaignée de l'induction par surstimulation. Si ces deux facteurs induisent une fatigue physiologique du système laticifère (Tupy et Primot, 1976 ; Low et Gomez, 1982 ; Pakianathan *et al.*, 1982 ; Van de Sype, 1984 ; Prévôt *et al.*, 1988 ; Sivakumaran *et al.*, 1994), la surstimulation se traduit par une symptomatologie très particulière (de Fay et Jacob, 1989), avec la mise en place et

(1) Centre international en recherche agronomique pour le développement.

(2) Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération.

l'accélération de phénomènes de sénescence entraînant l'arrêt de l'écoulement (Chrestin, 1984). En règle générale, ces mécanismes sont réversibles après l'arrêt de la surexploitation par sursaignée ou surstimulation (Van de Sype, 1984).

Le deuxième type d'encoche sèche est couramment appelée *bark necrosis*. On se trouve confronté à l'apparition, spontanée ou non, d'arbres atteints de nécrose de l'écorce. Il se produit un brunissement des tissus du liber qui signale la sénescence des laticifères et des tissus voisins (de Fay *et al.*, 1989 ; Gomez *et al.*, 1990 ; Nandris *et al.*, 1991) : le tissu producteur est totalement désorganisé. La maladie se propage dans tous les sens, au-dessus du panneau de saignée, sur le panneau opposé à celui en exploitation. Le plus souvent, la fatigue physiologique intrinsèque du tissu laticifère n'est pas en cause. Ces réactions spécifiques de l'écorce de l'hévéa sont une réponse à des stress. Mais lequel d'entre eux en est la cause ? L'hypothèse de l'action d'un agent pathogène n'est pas écartée (Nandris *et al.*, 1991) mais pas encore démontrée bien que la présence de rickettsies dans les tissus malades ait parfois été décelée (Zheng *et al.*, 1988 ; Chen *et al.*, 1994).

A partir de ces connaissances, de nouveaux outils moléculaires devraient permettre de mieux comprendre les mécanismes de production et de régulation. D'un point de vue scientifique, parmi les raisons qui font qu'un clone d'hévéa est haut ou bas producteur, sensible ou non à la stimulation hormonale, résistant ou non à la maladie de l'encoche sèche, il est maintenant évident qu'il existe des facteurs génétiques exprimés au niveau moléculaire dans les tissus producteurs. Les techniques de biologie moléculaire offrent la possibilité de relier les événements phénotypiques au fonctionnement du génotype et d'étudier la régulation de son expression au sein des laticifères eux-mêmes.

Matériel et méthodes

L'étude a porté sur le *Tapping Panel Dryness* qui apparaît spontanément au sein d'une parcelle du clone RRIM 600, exploité dans les conditions standard en Thaïlande : demi-spirale descendante, saignée tous les deux jours (1/2S d/2). Les arbres ont été ouverts à huit ans et sont en quatrième année de saignée, sans changement annuel de panneau. Des arbres sélectionnés selon leur circonfé-

rence appartiennent aux classes d'encoche sèche suivantes Van de Sype, 1984, (dix arbres par classe) :

- classe 0 : arbres sains, ne présentant aucun symptôme visuel de difficulté d'écoulement ;
- classe 1 : arbres présentant 10 % de longueur d'encoche sèche ;
- classe 3 : arbres présentant 50 % de longueur d'encoche sèche ;
- classe 5 : arbres présentant 80 % à 100 % de longueur d'encoche sèche.

Le latex est récolté arbre par arbre dans des tubes Eppendorf, 5 min après la saignée de manière à éliminer les premières fractions instables non représentatives de l'ensemble du latex écoulé. Les échantillons sont immédiatement congelés dans l'azote liquide afin d'inhiber l'action éventuelle des protéases.

Au laboratoire, les tubes de récolte sont centrifugés une heure à 10 000 tours par minute à 4 °C de façon à séparer la phase cytosolique du caoutchouc et de la fraction lourde (essentiellement les organites du latex). On compare les profils protéiques des cytosols d'arbres sains à ceux d'arbres malades par électrophorèse monodimensionnelle d'abord, puis bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide ensuite. La première sépare les protéines dans un milieu dénaturant (SDS-Page), en fonction de leur taille.

Dans le cas de l'électrophorèse bidimensionnelle, la technique employée est celle décrite par O'Farrell (1975), modifiée par Trousselot (communication personnelle). Dans la première dimension (1), *iso-electric focusing* (IEF), les protéines natives sont séparées dans un champ électrique selon leur charge nette dans un gradient de pH, ici pH 7 à pH 5 ; la migration s'arrête au niveau de leur point isoélectrique. Dans la deuxième dimension (2), les protéines sont séparées selon leur taille uniquement, en conditions dénaturantes (SDS-Page). Les marqueurs de poids moléculaires proviennent de chez Sigma (réf. MW-SDS-70L).

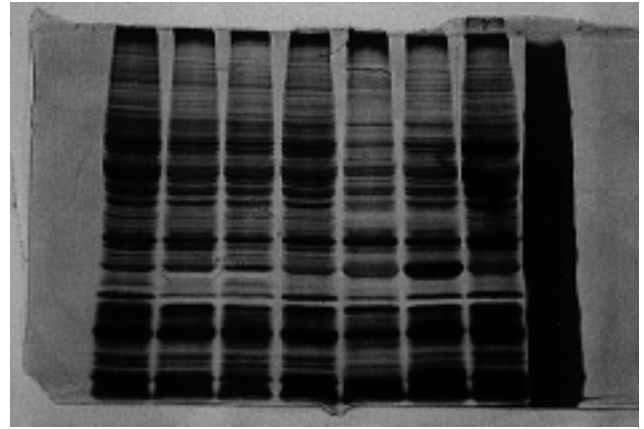


Photo 1. Electrophorèse monodimensionnelle d'échantillons cytosoliques d'arbres sains et malades. Profils protéiques obtenus à partir de 40 g de protéines chargées dans les puits, en conditions dénaturantes ; gel à 12,5 % de polyacrylamide, courant de 15 mA par gel. Les classes de la maladie sont : (0) : encoche saine, (1) : 10 % d'encoche malade, (3) : 50 % d'encoche malade, (5) : 90 % d'encoche malade. Les marqueurs de poids moléculaires sont positionnés sur la droite. / Isoelectric focusing of cytosolic samples from healthy and diseased trees. Protein banding patterns obtained with 40 g of proteins in wells, under denaturing conditions; 12.5 % polyacrylamide gel, current 15 mA per gel. The disease categories were: (0): healthy tapping panel, (1): 10 % dry cut, (3): 50 % dry cut, (5): 90 % dry cut. The molecular weight markers are on the right-hand side.

Après électrophorèse, les protéines sur gels sont ensuite fixées dans un mélange de méthanol-acide puis colorées au nitrate d'argent.

Résultats

Les résultats présentés ici sont confirmés à grande échelle puisqu'ils sont le reflet synthétique de quelques 300 gels réalisés et analysés depuis le début de l'expérimentation.

L'électrophorèse monodimensionnelle montre des variations quantitatives au niveau d'une bande d'un poids moléculaire d'environ 22 kiloDaltons (kDa). L'intensité de la coloration de cette bande, donc la quantité en protéines, est corrélée avec la gravité de la maladie (photo 1). Il y a là une ou plusieurs protéines marqueurs, dont la synthèse semble liée à la présence de la maladie. En électrophorèse bidimensionnelle, les profils protéiques des arbres sains et malades présentent des différences dans la zone de poids moléculaires comprise entre 29 kDa et 14 kDa et pratiquement sur toute l'étendue de la gamme de pH. On observe un certain nombre de protéines dont la synthèse est plus forte dans le cas de l'encoche sèche. Ces protéines sur-exprimées seraient des marqueurs quantitatifs dont l'expression suit le gradient de la maladie ; classe 1, classe 3, classe 5. D'autres protéines, en revanche,

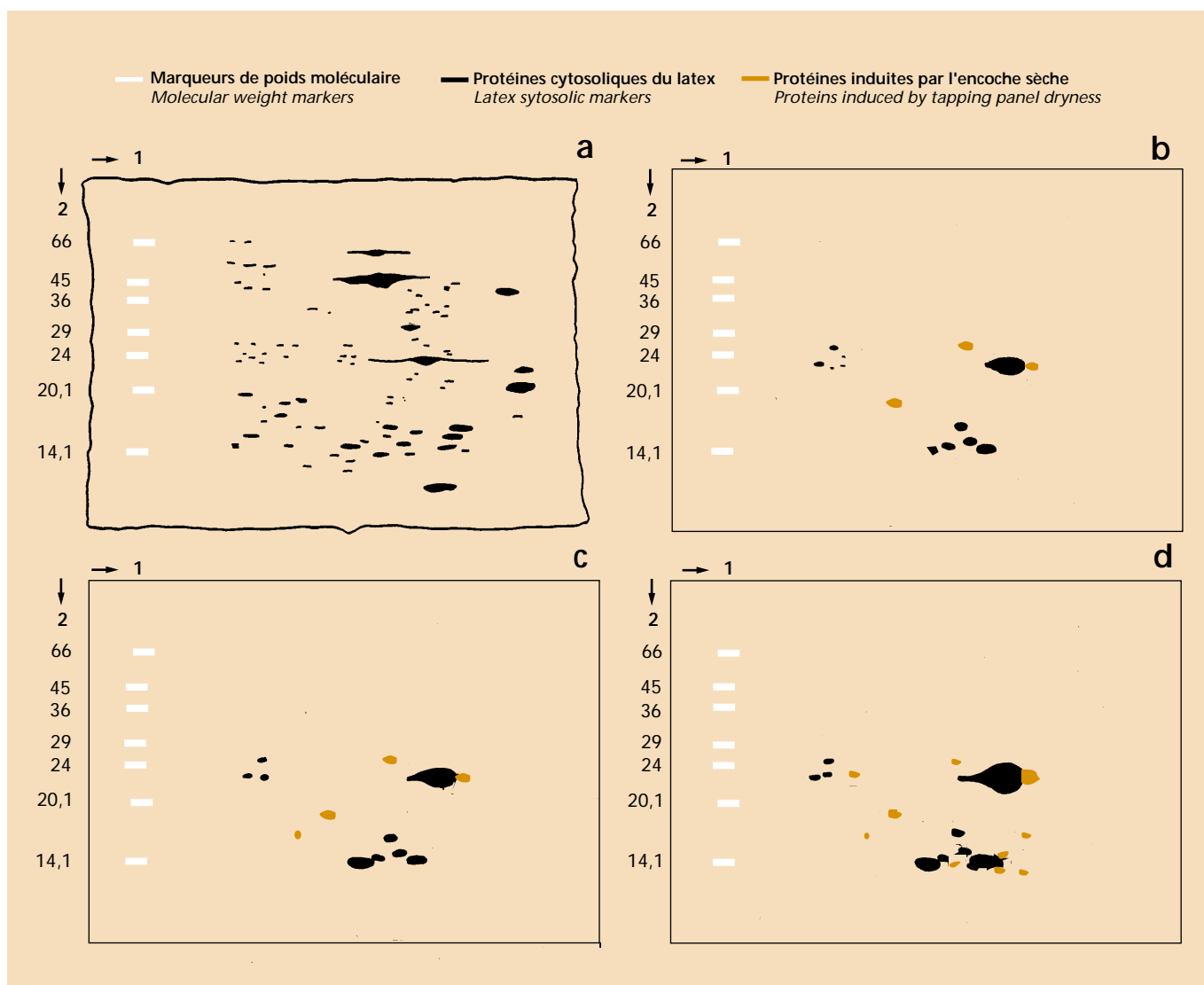


Figure 1. Chromatographie bidimensionnelle des protéines de latex issu d'un arbre sain (a) et d'arbres présentant un syndrome d'encoche sèche d'importance croissante (longueur d'encoche sèche b : 10 %, c : 50 %, d : 90 %). Sur le schéma (a) sont représentées toutes les protéines révélées. Sur les autres schémas (b, c, d) ne sont représentées, en brun, que les protéines dont la quantité augmente avec la gravité de la maladie, en noir que les protéines qui apparaissent seulement en cas d'encoche sèche. Profils protéiques obtenus à partir de 40 g de protéines chargées sur le gel en première dimension ; temps de migration 3 h 30 à 750 volts. La deuxième dimension est effectuée sur gel de polyacrylamide à une concentration de 12,5 %, au travers d'un courant de 15 mA par gel. Les marqueurs de poids moléculaires sont positionnés sur la gauche.

Two-dimensional chromatography of latex proteins from a healthy tree (a) and from trees with increasing degrees of tapping panel dryness (length of dry cut b: 10%, c: 50%, d: 90%). Diagram (a) shows all the proteins developed. In the other diagrams (b, c, d) only those proteins increasing in quantity in line with disease severity are shown in brown, and those only occurring in the event of tapping panel dryness are shown in black. Protein banding patterns obtained with 40 g of proteins on gel in the first dimension; migration time 3 1/2 hours at 750 Volts. The second dimension was carried out on 12.5% polyacrylamide gel, with a 15 mA current per gel. The molecular weight markers are on the left-hand side.

sont totalement nouvelles dans le cas des arbres atteints et n'existent donc pas chez les arbres sains. L'intensité de l'expression de ces marqueurs qualitatifs, synthétisés *de novo*, est fonction de la gravité de la maladie.

La figure 1 reprend de manière plus synthétique les photos des gels originaux.

Le profil électrophorétique (a) est celui d'un arbre sain, où apparaissent un grand nombre de *spots*. Dans le profil (b), celui d'un arbre dont l'encoche de saignée est sèche sur 10 % de sa lon-

gueur, un certain nombre de protéines voient leur synthèse accrue. Quatre d'entre elles se situent entre 20,1 kDa et 14 kDa dans une zone de pH comprise entre 6 et 5,5. Une, majoritaire, aux alentours de 22 kDa, pH iso-électrique (pHi) d'environ 5,5 et deux minoritaires entre 29 et 24 kDa ; pHi aux alentours de 7. Trois protéines nouvelles apparaissent une, d'un poids moléculaire d'environ 19 kDa dans la zone de pH 6,5, une autre se situe entre 29 kDa et 24 kDa, pHi 6 et la

troisième très proche de celle majoritairement induite vers 22 kDa, pHi 5,5.

Dans le profil C (50 % d'encoche sèche), les *spots* des marqueurs protéiques, comparés au stade 1, s'accroissent en surface, signalant une synthèse encore accrue pour un stade de la maladie plus avancé. Une nouvelle protéine, d'un poids moléculaire estimé à 18 kDa, pHi 6,5, apparaît même si son expression est très réduite.

Le profil (d), celui d'un arbre presque entièrement sec (80 à 100 % d'encoche

sèche), est sensiblement différent. Six nouvelles protéines apparaissent entre 20,1 kDa et 14 kDa dans une zone de pH comprise entre 6 et 5,5. Quatre d'entre elles sont concentrées pour des poids moléculaires de 17 kDa à 14 kDa. Une autre protéine nouvelle apparaît vers 22 kDa, sensiblement moins acide que les autres, pHi entre 7 et 6,5.

Conclusion

Comme certains travaux l'avaient envisagé (Dian, 1993), l'approche «en aveugle» par électrophorèse de protéines totales du latex s'avère extrêmement intéressante puisqu'elle nous a permis de distinguer les arbres malades des arbres sains. A l'intérieur du groupe d'arbres malades, il nous est possible de caractériser les arbres plus ou moins gravement atteints par la maladie de l'encoche sèche. En effet, dès le stade 1 de la maladie, trois protéines nouvelles apparaissent, la synthèse de sept autres est accentuée. Au stade le plus avancé (stade 5), le bilan est le suivant : huit protéines ont leur synthèse accrue, onze protéines sont synthétisées *de novo*.

L'étape suivante (en cours) est la purification d'un ou de plusieurs marqueurs, les plus significatifs, afin :

- d'obtenir des anticorps polyclonaux par immunisation de lapins, qui permettra, par test Elisa, de détecter rapidement et très précocement les arbres sensibles à la maladie, mais aussi les porteurs sains ;
- de cribler une banque d'expression de gènes exprimés spécifiquement dans les laticifères dans le but de connaître leur identité et leur fonction ;
- de microséquencer ce(s) marqueur(s) dans le même but, mais aussi d'identifier le ou les gènes responsables de leur synthèse ainsi que leurs promoteurs et leurs facteurs de régulation.

Cette approche moléculaire devrait donc, dans un premier temps, conduire à la mise au point d'un test de détection précoce de la maladie sur des arbres en exploitation ainsi que sur de tous jeunes hévéas, en pépinière ou en jardin à bois. Dans un deuxième temps, la connaissance des agents causaux du syndrome de la maladie des encoches sèches devrait permettre la mise en oeuvre de procédés préventifs ou curatifs, voire, par transformation génétique, d'obtenir des clones résistants. ■

Bibliographie / References

- CHEN M., HUANG Q., LUO D., YE S., 1994. Causative agents of Hevea brown bast and witches' broom and their relationship. In : IRRDB TPD Workshop, 26-28 July 1994. Hainan, Chine, South china academy of tropical crops, 10 p.
- CHRESTIN H., 1984. Le compartiment vacuo-lysosomal (lutoïdes) du latex d'*Hevea brasiliensis* : son rôle dans le maintien de l'homéostasie et dans les processus de sénescence des cellules laticifères. Thèse de doctorat d'Etat, université de Montpellier II, France, 535 p.
- CHRESTIN H., 1989. Metabolic regulation and homeostasis in the laticiferous cell. In : Physiology of rubber tree latex, J. d'Auzac, H. Chrestin et J.L. Jacob éd., Boca Raton, Etats-Unis, CRC Press, p. 165-178.
- CHUA S.E., 1966. Physiological changes in *Hevea brasiliensis* tapping panels during the induction of dryness by interruption of phloem transport. II. Changes in bark. J. Rubber Res. Inst. Malays. 19 : 277-282.
- DIAN K., 1993. Bases moléculaires de l'encoche sèche chez *Hevea brasiliensis*. Mull. Arg. Compréhension des phénomènes moléculaires à l'origine de la maladie. Recherche de marqueurs de résistance par électrophorèse des protéines totales. Thèse de 3^e cycle, université des sciences, Abidjan, Côte d'Ivoire, 144 p.
- FAY E. DE, HEBANT C., 1980. Etude histologique des écorces d'hévéa atteintes de la maladie des encoches sèches. C.R. Acad. Sci. Ser. D 291 : 865-868.
- FAY E. DE, JACOB J.L., 1989. Symptomatology, histological and cytological aspects of the bark dryness disease. In : Physiology of rubber tree latex, J. d'Auzac, H. Chrestin et J.L. Jacob éd., Boca Raton, Etats-Unis, CRC Press, p. 407-430.
- GOMEZ J.B., SAMSIDAR H., GHANDIMATHY H., HO L., 1990. The brown bast syndrome of hevea. Part II. Histological observations. J. Nat. Rubber Res. 5 : 90-101.
- HAO B., WU J., 1993a. Ultrastructure of radial extension of brown bast in diseased Hevea in resting. Chinese J. Trop. Crops 14 : 47-51.
- HAO B., WU J., 1993b. Ultrastructure of laticifers in drying bark induced by over exploitation of *Hevea brasiliensis* with ethephon. J. Nat. Rubber Res. 8 : 286-292.
- JACOB J.L., PRÉVÔT J.C., LACROTTE R., 1994. L'encoche sèche chez *Hevea brasiliensis*. Plantations, recherche, développement 1 (3) : 15-21.
- LOW F.C., GOMEZ J.B., 1982. Carbohydrates status of exploited Hevea. I. The effect of different exploitation systems on the concentration of the major soluble carbohydrates in latex. J. Rubber Res. Inst. Malays. 30 : 1-18.
- NANDRIS D., CHRESTIN H., NOIROT M., NICOLE M., THOUVENEL J.C., GEIGER J.P., 1991. La nécrose du phloème du tronc de l'hévéa en Côte d'Ivoire : 1 Symptomatologie et caractéristiques biochimiques. Eur. J. For. Pathol. 21 : 325-339.
- O'FARRELL P., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250 : 4007-4021.
- PAKIANATHAN S.W., SAMSIDAR H., SIVAKUMARAN S., GOMEZ J.B., 1982. Physiological and anatomical investigation on long term ethephon stimulated trees. J. Rubber Res. Inst. Malays. 30 : 63-79.
- PARANJOTHY K., GOMEZ J.B., YEANG H., 1976. Physiological aspects of brown bast development. In : International rubber conference. Kuala Lumpur, Malaysia, Rubber Research Institute of Malaysia, 2 : 181-202.
- PRÉVÔT J.C., JACOB J.L., LACROTTE R., VIDAL A., SERRES E., ESCHBACH J.M., GIGAULT J., 1988. Physiological parameters of latex from *Hevea brasiliensis*. Their use in the study of the laticiferous system. Typology of functioning production mechanisms. Effects of stimulation. In : IRRDB physiology and exploitation meeting, Hainan, 1986, Pan Yanqing et Lhao Canwen éd., Hainan, China, South china academy of tropical crops, p. 136-157.
- SIVAKUMARAN S., LEONG S.K., GHOUSE M., NG A.P., SYVANADYAN K., 1994. Influence of some agronomic practices on tapping panel dryness in Hevea trees. In : IRRDB TPD Workshop, 26-28 July 1994. Hainan, Chine, South china academy of tropical crops, 26 p.
- TUPY J., PRIMOT L., 1976. Control of carbohydrates metabolism by ethylene in latex vessels in *Hevea brasiliensis* in relation to rubber production. Biol. Plant. 18 : 373-384.
- VAN DE SYPE H., 1984. The dry cut syndrome of *Hevea brasiliensis*. Evolution, agronomical and physiological aspects. In : Colloque exploitation-physiologie de l'hévéa, Montpellier, France, 9-12 juillet 1984. Paris, France, IRCA/GERDAT, p. 249-272.
- WU J., HAO B., 1994. Ultrastructural observations of brown bast in *Hevea brasiliensis*. IRRDB TPD Workshop, 26-28 July 1994. Hainan, Chine, South china academy of tropical crops, 10 p.
- ZHENG G.B., CHEN M.R., YUNG S.W., CHEN Z.Y., SHEN J.Y., 1988. A further report in the study of causative agents and control of brown bast disease of rubber trees. J. S. China Agric. Univ. 9 : 22-23.

Hevea: protein markers of tapping panel dryness

Lacrotte R.¹, Gidrol X.², Vichitcholchai N.³, Pujade-Renaud V.¹, Narangajavana J.⁴, Chrestin H.²

1 CIRAD-CP, Mahidol University, Faculty of Science, Department of Biotechnology, 10400 Bangkok, Thailand

2 ORSTOM, Mahidol University, Faculty of Science, Department of Biotechnology, 10400 Bangkok, Thailand

3 RRIT, Rubber Research Center, 24160 Chachoengsao, Thailand

4 Mahidol University, Faculty of Science, Department of Biotechnology, 10400 Bangkok, Thailand.

The following results were obtained in a CIRAD⁽¹⁾-ORSTOM⁽²⁾ research programme implemented in Thailand to detect and characterize latex protein markers for early detection of induced tapping panel dryness (TPD).

Latex production from certain trees in rubber plantations sometimes becomes abnormally low or dries up completely. The number of affected trees increases by 1% a year, or considerably more in the event of over-tapping. This spontaneous drying up of the tapping panel usually goes hand in hand with numerous abnormalities, notably brown discoloration of the bark. Once the trees have reached this serious stage they are no longer tapped. Latex production depends on the number of trees affected and can drop substantially, raising serious economic problems.

The term «brown bast» commonly used by researchers for this phenomenon has now been replaced by «Tapping Panel Dryness». In fact, the syndrome is not restricted to the cut alone, but affects the entire tapping panel.

Despite the knowledge acquired of diseased tree cytology and histology (Paranjothy *et al.*, 1976; de Fay and Hébert, 1980; Hao and Wu, 1993a, 1993b; Wu and Hao, 1994), and of physiology and biochemistry, which has revealed the relation between cellular homeostasis and yields (Van de Syde, 1984; Chrestin, 1989) the original causes of the disease remain unknown. Whilst it is clear that Tapping Panel Dryness is caused by physiological disorders in the actual latex-bearing system (Chua, 1966; Paranjothy *et al.*, 1976; Gomez *et al.*, 1990), and despite the vast amount of knowledge already acquired, no effective control method can yet be proposed.

The various types of TPD have been described by Jacob *et al.* (1994), who make a distinction between non-necrotic and necrotic dry panels.

In the first case, whilst the structure of the latex vessels may be affected, their metabolism is very severely disrupted, though a distinction needs to be made between disease induction by over-tapping and induction by over-stimulation. Whilst both these factors induce physiological fatigue in the

latex-bearing system (Tupy and Primot, 1976; Low and Gomez, 1982; Pakianathan *et al.*, 1982; Van de Syde, 1984; Prévôt *et al.*, 1988; Sivakumaran *et al.*, 1994), over-stimulation is reflected in a highly specific symptomatology (de Fay and Jacob, 1989), with the initiation and acceleration of ageing phenomena that lead to a total halt in latex flow (Chrestin, 1984). These mechanisms are usually reversible once over-exploitation by excessive tapping or stimulation stops (Van de Syde, 1984).

The second type of tapping panel dryness is commonly called bark necrosis, in which trees affected by bark necrosis appear spontaneously, or not. The bast tissues turn brown, indicating senescence of the latex vessels and surrounding tissues (de Fay *et al.*, 1989; Gomez *et al.*, 1990; Nandris *et al.*, 1991): the producing tissue is totally disorganized. The disease spreads in all directions above the tapping panel and onto the panel opposite the one being tapped. Intrinsic physiological fatigue of the laticiferous tissue is not usually the cause. These specific reactions of rubber tree bark are a response to different types of stress, but which type is to blame? The hypothesis of pathogen involvement has not been ruled out (Nandris *et al.*, 1991) but it has yet to be proved, though rickettsiae have sometimes been found in diseased tissues (Zheng *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1994).

New molecular tools based on this knowledge should provide a better understanding of production and regulation mechanisms. Scientifically speaking, it is now clear that one of the reasons why a rubber clone is a high or low yielder, receptive or not to hormonal stimulation, resistant or not to tapping panel dryness, is the existence of genetic factors expressed at molecular level in the latex producing tissues. Molecular biology techniques offer the possibility of linking phenotypic events to genotype functioning and studying how its expression is regulated within the actual latex vessels.

Material and methods

A study was made of Tapping Panel Dryness which occurred spontaneously within a plot of RRIM 600 clones exploited under standard conditions in Thailand; downward half spiral, tapping every other day (1/2 S d/2). The trees were opened at eight years and had been tapped for four years, with no annual change of tapping panel. The trees were

selected according to their circumference and belonged to the following tapping panel dryness categories Van de Syde, 1984, (ten trees per category):

- category 0: healthy trees with no visible flow problem symptoms,
- category 1: trees with a cut dry along 10% of its length,
- category 3: trees with a cut dry along 50% of its length,
- category 5: trees with a cut dry along 80% to 100% of its length.

Latex was collected in Eppendorf tubes from each tree 5 minutes after the start of tapping, so as to eliminate the first unstable fractions not representative of the latex flow as a whole. The samples were immediately frozen in liquid nitrogen to inhibit any protease action.

In the laboratory, the tubes of latex were centrifuged at 10,000 rpm for an hour at 4°C, to separate the cytosolic phase of the rubber from the heavy fraction (mainly latex organelles). The protein banding patterns of the cytosols from healthy trees were compared to those of diseased trees, firstly by one-dimensional electrophoresis, then by two-dimensional electrophoresis on polyacrylamide gel. The first process separated the proteins in a denaturing medium (SDS-Page) according to size.

The two-dimensional electrophoresis technique used was that described by O'Farrell (1975), modified by Trousselot (personal communication). In the first dimension (1), isoelectric focusing (IEF), the native proteins were separated in an electric field according to their net charge in a pH gradient, pH 7 to pH 5 in this case; migration stopped at their isoelectric point. In the second dimension (2), the proteins were separated according to size only, under denaturing conditions (SDS-Page). The molecular weight markers were obtained from Sigma (ref. MW-SDS-70L).

After electrophoresis, the gel-borne proteins were fixed in a methanol-acid mixture then stained with silver nitrate.

Results

The results obtained were confirmed on a large scale, being a representative reflection of 300 gels produced and analyzed since the beginning of the experiment.

(1) Centre international en recherche agronomique pour le développement.

(2) Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération.

Isoelectric focusing revealed quantitative variations in one band with a molecular weight of around 22 kiloDaltons (kDa). The stain intensity of this band, hence the quantity of proteins, was correlated to disease severity (photo 1). There were therefore one or more marker proteins, whose synthesis seemed to be linked to the existence of the disease. With two-dimensional electrophoresis, the protein banding patterns for healthy and diseased trees revealed differences for molecular weights of between 29 kDa and 14 kDa, and practically throughout the pH range. Some proteins were found whose synthesis was greater in the case of tapping panel dryness. These over-expressed proteins would seem to be quantitative markers whose expression follows the disease gradient: category 1, category 3, category 5. On the other hand, some proteins from infected trees were totally new and did not exist in healthy trees. The expression intensity of these newly synthesized qualitative markers depended on disease severity.

The figure 1 summarizes the photos of the original gels.

Electrophoretic banding pattern (a), where a large number of spots occur, is that of a healthy tree. In pattern (b), that of a tree with a tapping cut dry along 10% of its length, there is increased synthesis of a certain number of proteins. Four of them are between 20.1 kDa and 14 kDa in a pH zone between 6 and 5.5. The predominant one is around

22 kDa, with an isoelectric pH (pHi) of around 5.5, and there are two minor ones between 29 and 24 kDa, pHi around 7. Three new proteins appeared: one with a molecular weight of around 19 kDa in the pH 6.5 zone, another between 29 kDa and 24 kDa, pHi 6, and the third very close to the predominant one around 22 kDa, pHi 5.5.

At stage C of the disease (50 % dry cut), compared to stage 1, the area of the protein marker spots increased, indicating even greater synthesis for a more advanced stage of the disease. A new protein, with a molecular weight estimated at 18 kDa, pHi 6.5, also appeared though its expression was very limited.

Banding pattern (d), that of an almost completely dry tree (80 to 100% dry cut), is considerably different. Six new proteins appeared between 20.1 kDa and 14 kDa in a pH zone between 6 and 5.5. Four of them were concentrated for molecular weights of 17 kDa to 14 kDa. Another new protein occurred around 22 kDa, and was substantially less acid than the others, pHi between 7 and 6.5.

Conclusion

As some authors had already suggested (Dian, 1993), the «blind» approach by electrophoresis of total latex proteins has proved extremely useful, since it has enabled us to distinguish between diseased and healthy trees. Within a group of diseased trees, it is possible to characterize trees that

are affected by tapping panel dryness to varying degrees. Indeed, three new proteins appear right from stage 1 of the disease, and the synthesis of another seven is increased. At a more advanced stage (5), there was increased synthesis of eight proteins and eleven proteins were newly synthesized.

The next step (under way) is to purify one or more markers, the most significant ones, in order to:

- obtain polyclonal antibodies by immunizing rabbits, so that trees susceptible to the disease, and also healthy carriers, can be detected rapidly and very early on by the Elisa test,
- screen an expression bank of genes expressed specifically within latex vessels, to ascertain their identity and function,
- microsequence the marker(s) for the same purpose, but also to identify the gene(s) responsible for their synthesis, along with their promoters and regulation factors.

This molecular approach should therefore initially result in the development of an early detection test for the disease on tapped trees, and on very young rubber trees, either in nurseries or budwood gardens. Then, once the causal agents of the tapping panel dryness syndrome are known, it should be possible to implement preventive or curative procedures, or even obtain resistant clones by genetic transformation. ■